Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Involvement of autophagy in the maintenance of rat intervertebral disc homeostasis: an in-vitro and in-vivo RNA interference study of Atg5

辻本, 龍

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2022-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8319号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008319

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Involvement of autophagy in the maintenance of rat intervertebral disc homeostasis: an *in-vitro* and *in-vivo* RNA interference study of Atg5

ラット椎間板恒常性維持におけるオートファジーの関与：
Atg5 に対する RNA 干渉法を用いた細胞・動物実験による検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒田　良祐教授）

辻本　龍

【目的】

腰痛は生涯の有訴率が 80%を超える高頻度の症候であり，その危険因子の 1 つに椎間板変性が挙げられる．椎間板は周囲の線維輪が中心の髄核を取り囲み，軟骨終板によって脊椎椎体と隔てられた構造をとる人体最大の無血管組織であり，椎間板への栄養供給は軟骨終板を介した椎体からの拡散に依存している．加齢や喫煙等で栄養供給が低下すると椎間板は変性をきたし，細胞外基質変性や細胞死「アポトーシス」，細胞老化「セネッセンス」を生じる．自己貪食「オートファジー」は低栄養等のストレス条件下で細胞が自己の余剰蛋白・老廃物を分解，再利用して生存を図る細胞内恒常性維持機構である．今回我々は，低栄養に曝されている椎間板は恒常性維持をオートファジーに依存していると仮説を立て，椎間板におけるオートファジーの役割を明らかにすべく，オートファジー必須因子である autophagy-related gene 5（Atg5）への RNA 干渉法を用いたオートファジー阻害実験を in vitro と in vivo で行った．

【方法】

細胞実験：12 週齢雄 SD ラット 20 匹から椎間板髄核細胞を抽出し，1%酸素存在下で培養した後，リバーストランスフェクション法を用いて Atg5 の発現を特異的に抑制する small interfering RNA（siRNA）を導入した．オフターゲット効果を除外するために 3 種類の異なる配列の Atg5 siRNA を用いた．対照群には非特異的な control siRNA 配列を用いた．ウエスタンブロット法で Atg5 及びオートファジーのマーカーである LC3-II と基質である p62/SQSTM1 の発現を計測し，オートファジー活性について検討した．Atg5 siRNA 導入後，10%血清添加または無血清培地で 24 時間培養し，細胞生存率を Cell Counting Kit-8（CCK-8）法で検討した．さらに Atg5 siRNA 導入後，10 ng/ml の interleukin-1 beta（IL-1β）を添加した無血清培地で 24 時間培養後，ウエスタンブロット法で cleaved PARP・cleaved caspase-9 の発現からアポトーシスを，p53・p21/CIP1・p16/INK4a の発現からセネッセンスを検討した．また，TUNEL 染色でアポトーシスを，SA-β-gal 染色でセネッセンスをそれぞれ検討し，Atg5・TUNEL・p16/INK4a の多重蛍光免疫染色による検討も行った．

動物実験：12 週齢雄 SD ラット 42 匹を用いた．まず細胞内への siRNA の導入を確認するために，Alexa Fluor® 555 標識 siRNA を 33G 針でラット尾椎椎間板内へ注入し，2・28・56 日後に蛍光顕微鏡を用いて観察した．さらに生体内での RNA 干渉法の有効性を確認すべく，Atg5 siRNA と control siRNA を InvivofectamineTM 3.0 Reagent とともに同様にラット尾椎椎間板内へ注入した．投与後 2・28・56 日で髄核組織から蛋白検体を抽出し，ウエスタンブロット法で Atg5・LC3-II・p62/SQSTM1 の発現からオートファジー活性を検討した．次にラット尾椎椎間板静的圧迫モデルを用いて，第 8/9・9/10 尾椎間を圧迫群，第 11/12・12/13 尾椎間を対照群とし，第 8/9・11/12 尾椎間に control siRNA，第 9/10・12/13 尾椎間に Atg5 siRNA をそれぞれ注入した．圧迫後 0・7・28・56 日に単純 X 線像で disc height index（DHI）法を用いて椎間板高を比較検討した．さらに椎間板組織標本を作成し，サフラニン O 染色で変性度を検討し，また Atg5・TUNEL・

p16/INK4a の多重蛍光免疫染色を行った.

【結果】

細胞実験:RNA 干渉法によりいずれの配列でも Atg5 蛋白の有意な発現抑制を示し(P<0.0001), LC3-II の減少と p62/SQSTM1 の増加を認め，オートファジーの抑制が示唆された．CCK-8 法によるラット椎間板髄核細胞の生存率は低栄養（無血清）培養条件下では Atg5 干渉群で有意に低下していた(P=0.04). IL-1β による炎症刺激下ではラット椎間板髄核細胞で PARP の減少と cleaved caspase-9・cleaved PARP の増加を認めた．また，p53・p21/CIP1・p16/INK4a も発現が上昇していた．これらは Atg5 siRNA 群でより顕著であり、ストレス環境下でオートファジー抑制によるアポトーシス・セネッセンス活性の上昇が確認された．ATG5 siRNA 導入群では炎症刺激により TUNEL 染色で TUNEL 陽性細胞数が, SA-β-gal 染色で SA-β-gal 陽性細胞数がそれぞれ増加し，多重蛍光免疫染色で TUNEL と p16/INK4a の発現が増加した.

動物実験：蛍光顕微鏡による観察では，注入後 56 日まで髄核細胞内での Alexa Fluor® 555 標識 siRNA の存在が確認された．ラット椎間板内への Atg5 干渉により髄核における Atg5 蛋白発現の減少に加え，LC3-II の減少と p62/SQSTM1 の増加を注入後 56 日まで認め，生体内でのオートファジーの抑制が示された．ラット尾椎椎間板静的圧迫モデルでの X 線学的な椎間板高に関して，圧迫群では Atg5 干渉群，control 群とも非圧迫群と比較して圧迫後 7 日より有意な低下を認めた．椎間板高の低下は Atg5 干渉/圧迫群で顕著であり，オートファジー抑制による椎間板高低下の促進を認めた（対 control/圧迫群：56 日 P=0.04）．サフラニン O 染色による組織変性度の検討において，圧迫群では非圧迫群と比較して変性が早期に進行していた．さらに Atg5 干渉/圧迫群では control/圧迫群と比較し変性度が有意に高かった(56 日 P=0.03). 多重蛍光免疫染色で Atg5 干渉群では control 群と比べて Atg5 発現が低下していた．Atg5 干渉/圧迫群で TUNEL と p16/INK4a の発現が Atg5 干渉/非圧迫群と control/圧迫群に対して増加していた．以上より，圧迫負荷によるストレス条件下でのアポトーシスとセネッセンスの誘導を認め，Atg5 の抑制を介したオートファジー阻害による両者のさらなる亢進が示された.

【考察】

本研究ではまず細胞実験から RNA 干渉法を用いた Atg5 の発現抑制を介したオートファジーの阻害をラット椎間板髄核細胞で確認した．オートファジーの抑制により低栄養条件下での細胞生存率の低下，さらに炎症刺激下でのアポトーシス・セネッセンスの亢進を認めた．動物実験ではラット椎間板組織内への Atg5 siRNA の導入により，56 日間に渡るオートファジーの抑制が確認された．ラット椎間板静的圧迫モデルでは Atg5 干渉/圧迫群で X 線学的椎間板高の低下と組織学的変性の進行を認めた．多重蛍光免疫染色では Atg5 干渉による Atg5 発現の低下，さらに Atg5 干渉/圧迫群で顕著なアポトーシス・セネッセンスの誘導が確認された．以上より，RNA 干渉法を用いることでラット椎間板細胞と組織における Atg5 依存性オートファジーの存在が確認された.

【結語】

本研究の結果より，オートファジーの阻害によるラット椎間板変性の促進が確認され，オートファジーの椎間板恒常性維持への関与が示唆された．オートファジーは細胞生物学的治療の標的となる可能性があることが示された.

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3170 号	氏　名	辻本 龍
論文題目 Title of Dissertation	Involvement of autophagy in the maintenance of rat intervertebral disc homeostasis: an *in-vitro* and *in-vivo* RNA interference study of Atg5 ラット椎間板恒常性維持におけるオートファジーの関与：Atg5 に対する RNA 干渉法を用いた細胞・動物実験による検討		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	筒井隆司 松本理器 鈴木聡	

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【序文】

腰痛は生涯の有訴率が80%を超える高頻度の症候であり，その要因の1つに椎間板変性が挙げられる．椎間板は周囲の線維輪が中心の髄核を取り囲み，軟骨終板によって脊椎椎体と隔てられた人体最大の無血管組織であり，その栄養供給は椎体からの拡散に依存している．加齢・喫煙等で栄養供給が低下すると椎間板は変性し，細胞外基質変性や細胞死「アポトーシス」，細胞老化「セネッセンス」を生じる．自己貪食「オートファジー」は低栄養等のストレス条件下で細胞が自己の余剰蛋白・老廃物を分解，再利用して生存を図る細胞内恒常性維持機構である．今回研究者らは，低栄養に曝されている椎間板は恒常性維持をオートファジーに依存していると仮説を立て，椎間板におけるオートファジーの役割を明らかにすべく，オートファジー必須因子であるautophagy-related gene 5(Atg5)へのRNA干渉法を用いたオートファジー阻害実験を細胞及び動物実験で行った．

【方法】

細胞実験:ラット椎間板髄核細胞にAtg5を標的としたAtg5 siRNAをリバーストランスフェクション法で導入し，ウエスタンブロット(WB)法で Atg5・LC3-II・p62/SQSTM1 の発現からオートファジー活性を検討した．Atg5 siRNA 導入後，無血清培地培養下での細胞生存率を CCK-8 法で検討した．同様に IL-1β で炎症刺激を加え，PARP・Cleaved PARP・p16/INK4a・p21/CIP1・p53 の発現から細胞死と細胞老化への影響を WB 法で検討した．また，TUNEL 染色で細胞死を，SA-β-gal 染色で細胞老化をそれぞれ検討し，Atg5・TUNEL・p16/INK4a の多重蛍光免疫染色による検討も行った．

動物実験:細胞内への siRNA の導入確認のために，Alexa Fluor® 555 標識 siRNA をラット尾椎椎間板内へ注入し，蛍光顕微鏡にて観察した．ラット尾椎椎間板に Atg5 siRNA を導入し，Atg5・LC3-II・p62/SQSTM1 の発現を WB 法で検討した．ラット尾椎椎間板静的圧迫モデルに Atg5 siRNA を導入し，X線像で椎間板高を，サフラニン O 染色で組織変性度を、蛍光免疫染色法で細胞死・細胞老化について検討した．

【結果】

細胞実験:RNA 干渉群での Atg5 の発現減少，LC3-II の減少と p62/SQSTM1 の増大からオートファジー抑制が示唆された．無血清培地培養下で細胞生存率が低下し(P＝0.004)，IL-1β 刺激下で Cleaved PARP・p16/INK4a ・p21/CIP1・p53 の増大，TUNEL 陽性細胞数，SA-β-gal 陽性細胞数の増加を認め，細胞死と細胞老化の誘導が示唆された．

動物実験:蛍光顕微鏡にて注入後 56 日まで髄核細胞内での Alexa Fluor® 555 標識 siRNA の存在が確認された．RNA 干渉群で生体内での Atg5 及び LC3-II の発現減少と p62/SQSTM1 の発現増大を認めた．静的圧迫モデルではコントロール群に対し RNA 干渉群で椎間板高減少(P＝0.04)と組織変性度の進行(P＝0.03)，細胞死・細胞老化の増加(細胞死:P＝0.01，細胞老化:P＝0.002)を認めた．

【考察および結論】

本研究ではまず細胞実験から RNA 干渉法による Atg5 発現抑制を介したオートファジーの阻害をラット椎間板髄核細胞で確認した．オートファジーの抑制により低栄養条件下での細胞生存率の低下，炎症刺激下での細胞死・細胞老化の亢進を認めた．動物実験ではラット椎間板組織

内への Atg5 siRNA の導入により，56 日間に渡るオートファジーの抑制が確認された．ラット椎間板静的圧迫モデルでは Atg5 干渉/圧迫群で X 線学的椎間板高の低下と組織学的変性の進行を認めた．多重蛍光免疫染色では Atg5 干渉による Atg5 発現の低下，さらに Atg5 干渉/圧迫群で顕著な細胞死・細胞老化の誘導が確認された．以上より，RNA 干渉法を用いることでラット椎間板細胞と組織における Atg5 依存性オートファジーの存在が確認された．

本研究は，RNA 干渉法を用いたオートファジーの阻害によりラット椎間板の変性が促進される事を初めて証明した報告である．本研究によりオートファジーの椎間板恒常性維持への関与が示唆され，オートファジーが細胞生物学的治療の標的と成り得るとした点で価値ある業績であると認める．

よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める．